# MycAssay™ Aspergillus
## Applied Biosystems 7500
## Muestras Respiratorias
**REF 080-045**

## Uso previsto

MycAssay™ Aspergillus está indicado para su uso por profesionales de laboratorio cualificados para la detección cualitativa del DNA genómico del género *Aspergillus* en muestras respiratorias de las vías respiratorias inferiores (p. ej., muestras bronquiales) como ayuda para el diagnóstico de pacientes adultos que se sospecha que podrían padecer una alergia o una infección por *Aspergillus*.

MycAssay™ Aspergillus ha sido validado para el uso con el sistema Applied Biosystems 7500 (con la versión del software SDS 1.4).

## Resumen y explicación

El género *Aspergillus* está constituido por mohos oportunistas ubicuos que causan síndromes tanto alérgicos como invasivos. Este género comprende aproximadamente 300 especies, de las cuales 41 se han asociado a enfermedades humanas. La mayoría de las infecciones son causadas por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*; menos frecuentemente también intervienen *A. nidulans*, y otras especies poco comunes como *A. sydowii, A. versicolor, A. lentulus y A. pseudofischeri*[1]. La mayoría de las infecciones y alergias causadas por el género *Aspergillus* afecta a las vías respiratorias. Las reacciones alérgicas incluyen aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y sinusitis alérgica causada por *Aspergillus* y son causadas normalmente por *A. fumigatus*. La aspergilosis pulmonar crónica comprende el aspergiloma, la aspergilosis pulmonar cavitaria crónica y la aspergilosis fibrosa crónica. La aspergilosis invasiva (AI) se desarrolla en grupos de pacientes de riesgo entre los que se incluyen aquéllos tratados con corticosteroides y los que presentan neutropenia o disfunción fagocítica (por ejemplo, enfermedad granulomatosa crónica e infección por el VIH). Alrededor del 80% de los casos de aspergilosis invasiva afecta a los pulmones[2].

El diagnóstico sistemático de la aspergilosis pulmonar invasiva consiste en la tomografía computarizada (TC), la broncoscopia y el lavado broncoalveolar (microscopia y cultivo), el análisis en sangre de antígenos de *Aspergillus* y el examen histológico de muestras de biopsia quirúrgica. En este contexto, los cultivos a menudo son falsamente negativos[3]. De hecho, el lavado broncoalveolar sólo es positivo en cultivo en aproximadamente el 40% de los casos incluso cuando el diagnóstico se confirma por otros medios[4,5,6,7], lo cual muestra la falta de sensibilidad del cultivo en la detección de la aspergilosis invasiva y de la aspergilosis pulmonar crónica. No obstante, los cultivos son importantes si son positivos, ya que muchas pruebas diagnósticas no indican ni el género ni la especie del hongo que causa la enfermedad, ni tampoco el perfil de sensibilidad de la cepa clínica aislada causante de la infección.

La aspergilosis broncopulmonar alérgica complica el asma y la fibrosis quística[8], y de forma infrecuente puede aparecer sin una enfermedad subyacente. La mayoría de los casos se asocia a *A. fumigatus*; en algunos casos hay otros hongos implicados. La enfermedad se caracteriza por obstrucción episódica de las vías respiratorias con tapones de esputo espeso llenos de hifas de *Aspergillus*, IgE total en suero > 1.000 UI/mL y anticuerpos detectables IgE e IgG específicos para *Aspergillus fumigatus* o una prueba de punción cutánea positiva para *Aspergillus*. Los cultivos de esputo pueden ser positivos para *A. fumigatus* y existe la posibilidad de observar bronquiectasias en una TC del tórax.

Los métodos actuales de diagnóstico de la aspergilosis pulmonar crónica son la combinación de la radiología (que no es específica)[9] y la serología (anticuerpos IgG frente a *Aspergillus* o precipitinas), que es positiva en la mayoría de las formas de aspergilosis (y que, por tanto, no es específica de ninguna manifestación particular de la aspergilosis)[1]. Los

[1] Base de datos de especies en www.aspergillus.org.uk.
[2] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Medical Mycology: 43 (suppl. 1): S207-38.
[3] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infectious Diseases: 9: 609-22.
[4] Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med: 86: 243-8.
[5] Greub G and Bille J. (1998) Aspergillus species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to deteremine significance. Clin Microbiol Infect 4: 710-716.
[6] Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L,Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases; 33:1824–33.
[7] Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients The Journal of Infectious Diseases. 186:1297–306.
[8] Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy: 60: 1004-13.
[9] Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. Med Mycol: 43 (Suppl 1): S147-54.

cultivos son positivos sólo en el 40%-65% de los casos confirmados mediante radiología y serología[10,11]. Dado que el diagnóstico diferencial es amplio, e incluye enfermedades tales como tuberculosis, micobacteriosis atípica, sarcoidosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis, neumoconiosis, pulmón reumatoide y espondiloartritis anquilosante entre otras, es importante documentar la presencia de especies de *Aspergillus* en las muestras respiratorias para evitar un retraso en la identificación de la aspergilosis pulmonar y su tratamiento erróneo.

MycAssay™ Aspergillus es un kit de diagnóstico molecular para la detección del DNA genómico del género *Aspergillus* mediante la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en tiempo real con baliza molecular[12]. El procedimiento completo del ensayo, incluida la extracción de DNA de la muestra clínica, puede realizarse en 4 horas, mientras que el cultivo de hongos puede requerir varios días para generar resultados positivos. Este ensayo ofrece ventajas sobre los métodos de diagnóstico actualmente disponibles para la aspergilosis pulmonar invasiva aguda y para la aspergilosis pulmonar crónica. Estas ventajas incluyen una detección más rápida del género *Aspergillus* y la posibilidad de una mayor sensibilidad para el género *Aspergillus* en pacientes con una inmunodepresión intensa que se sospecha que padecen aspergilosis pulmonar invasiva.

## Principios del procedimiento

Después de mezclar los reactivos del kit MycAssay™ Aspergillus con una muestra que contenga la secuencia diana de DNA de *Aspergillus* (una sección del gen ribosómico 18S de *Aspergillus*), se producirá la amplificación del DNA mediante un proceso de termociclado. El ensayo también contiene un control de amplificación interno (IAC, *internal amplification control*), que es un fragmento de DNA que no está presente en el genoma de *Aspergillus* ni en otros genomas fúngicos, ni tampoco en genomas bacterianos ni humanos, y cuya finalidad es detectar sustancias inhibidoras de la PCR y confirmar la funcionalidad de los reactivos del ensayo.

Las dianas de DNA amplificadas se detectan por medio de la tecnología de balizas moleculares. Las balizas moleculares son sondas de hibridación compuestas de un oligonucleótido de cadena sencilla que forma una estructura de horquilla. La porción curva de la horquilla contiene una secuencia sonda que es complementaria de una secuencia diana, y la porción recta de la horquilla está formada por hibridación de secuencias de brazo complementarias que se encuentran a cada lado de la secuencia sonda. Un extremo del brazo está unido de forma covalente a un fluoróforo, que emite fluorescencia cuando es excitado por una luz de la longitud de onda apropiada, mientras que el otro extremo del brazo está unido de forma covalente a un extintor de fluorescencia, que suprime la fluorescencia del fluoróforo cuando se encuentra en estrecha proximidad física. Las balizas moleculares no emiten fluorescencia cuando están libres en solución. Sin embargo, cuando se hibridan con una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia diana, experimentan un cambio conformacional que las separa físicamente del fluoróforo y del extintor de fluorescencia, lo cual les permite emitir fluorescencia al ser excitadas. La cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado, o después del ciclo, depende de la cantidad de amplicones específicos que estén presentes en ese momento. El sistema de PCR en tiempo real mide simultáneamente la fluorescencia emitida por cada baliza.

## Precauciones

- El kit está diseñado para ser usado solamente por profesionales de laboratorio. Es preciso poner en práctica procedimientos para la manipulación de muestras que no generen aerosoles. Deben seguirse las precauciones habituales y las directrices del centro para la manipulación de todas las muestras. Myconostica Ltd. tiene a su disposición una Hoja de datos sobre la seguridad de los materiales.
- Esta prueba está diseñada exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Esta prueba sólo debe utilizarse con el sistema Applied Biosystems 7500 con la versión del software SDS 1.4.
- No use los reactivos ni los controles si las bolsas protectoras llegan abiertas o rotas.
- Los reactivos y los controles no son intercambiables entre kits con números de lote diferentes.
- Nunca mezcle reactivos o controles de tubos diferentes, aunque sean del mismo lote.
- Nunca use los reactivos ni los controles después de su fecha de caducidad.
- Los reactivos y los controles no deben volver a congelarse ni a utilizarse una vez abiertos.
- Use ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos del kit.
- Evite la contaminación microbiana y con desoxirribonucleasa (DNAasa) de los reactivos cuando tome muestras parciales de los tubos.
- Se recomienda usar puntas de pipeta de desplazamiento positivo o con filtro desechables de baja retención, libres de DNAasa y estériles.

[10] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. Clin Infect Dis: 37 (Suppl 3): S265-80.
[11] Camuset J, Lavolé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. Rev Pneumol Clin. 63:155-166.
[12] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

- Use una nueva punta para cada muestra o reactivo.
- Deseche los reactivos no usados y el material de desecho de acuerdo con las normativas nacionales, federales, estatales y locales.
- Para evitar la contaminación con amplicones del IAC o *Aspergillus*, no abra los tubos de reacción después de la amplificación.
- Pueden analizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o las normativas locales, estatales, provinciales y federales o de las organizaciones responsables de la acreditación.
- No coma, beba ni fume en áreas donde se manipulen las muestras o los reactivos del kit.
- Las concentraciones bajas de DNA pueden ser inestables si no se conservan correctamente. Se recomienda almacenar las extracciones de DNA de muestras clínicas a una temperatura de -80 °C para preservar su integridad. Siempre que sea posible debe evitarse también realizar varias secuencias de descongelación y congelación.
- Este kit ha sido validado utilizando placas de PCR con semifaldón de 96 pocillos de 0,2 ml con película de sellado de grado óptico (Star Lab, n.º de catálogo E1403-8200 y Applied Biosystems, n.º de catálogo 4311971). La utilización de otras fuentes/tipos de plástico podría invalidar los umbrales y, por consiguiente, las afirmaciones recogidas en las instrucciones de uso. En caso de utilizar una fuente alternativa, se recomienda realizar la validación local con las reacciones de controles positivo y de control negativo.

## Contenido del kit

Descripción

El kit consta de cinco bolsas selladas de aluminio con 3 compartimentos cada una que se pueden sacar de la caja y usar por separado. Cada bolsa contiene reactivos suficientes para 8 reacciones.

| | | Volumen |
|---|---|---|
| **Tubo 1** (tapón naranja) | dNTPs<br>$MgCl_2$<br>Solución amortiguadora del complejo de la DNA polimerasa | 66 µL |
| **Tubo 2** (tapón verde) | < 0,01% de cebadores<br>< 0,01% de balizas moleculares<br>< 0,0001% de control de amplificación interno (IAC)<br>El control de amplificación interno es un plásmido de DNA recombinante que contiene una secuencia no infecciosa no relacionada con la secuencia diana (*Aspergillus*).<br>Amortiguador Tris-HCl | 66 µL |
| **Tubo 3** (tapón transparente) | control negativo<br>Agua | 25 µL |
| **Tubo 4** (tapón negro) | Control positivo<br>< 0,0001% de DNA de control positivo<br>La molécula de control positivo es un plásmido recombinante que contiene la secuencia diana de *Aspergillus*.<br>Amortiguador Tris-HCl | 25 µL |

El kit también contiene:

- CD-ROM *MycAssay™ Aspergillus Myconostica Protocol* (Protocolo del ensayo *MycAssay™ Aspergillus* de Myconostica)
- Instrucciones de uso
- Certificado de análisis

## Conservación

El kit debe guardarse congelado (a una temperatura de -15 °C a -25 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del kit, momento en el cual debe desecharse de acuerdo con la normativa local.

Una vez abierta una bolsa, debe usarse su contenido inmediatamente; no se puede volver a congelar ni a reutilizar más adelante.

## Equipo y materiales necesarios pero no incluidos

A. Equipo necesario
- Sistema de PCR en tiempo real de Applied Biosystems (incluyendo el manual de usuario, ordenador asociado y versión del software SDS 1.4).
- Placas con faldón/borde elevado de 96 pocillos y película de sellado de grado óptico (Star Lab, n.º de catálogo E1403-8200 y Applied Biosystems, n.º de catálogo 4311971).
- Gradilla de soporte para placas de 96 pocillos.
- Centrifugadora dotada de asientos para placas de 96 pocillos.

B. Equipo común necesario
- Microcentrifugadora.
- Agitadora vorticial (vórtex).
- Micropipetas (volúmenes requeridos: 7,5-20 µL).
- Puntas con filtro de baja retención estériles.
- Guantes desechables sin polvo.
- Solución comercial descontaminante de DNA.
- Rotulador permanente.
- Kit de aislamiento de DNA (véase más adelante).

## Muestra

La muestra para el ensayo MycAssay™ Aspergillus es DNA genómico total extraído de muestras clínicas de lavado broncoalveolar (BAL) y de otras muestras de las vías respiratorias inferiores. Se recomienda con este fin el siguiente equipo y kit de aislamiento, utilizados durante la validación:

- Kit de extracción de DNA fúngico MycXtra™ (REF: 080-005 disponible en Myconostica).
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Nueva York, EE. UU.).
- Plato adaptador para agitadora vorticial (REF: 080-015 disponible en Myconostica).

## Notas del procedimiento

- Lea el protocolo completo antes de comenzar.
- El proceso completo del ensayo MycAssay™ Aspergillus (excluida la extracción de DNA) dura aproximadamente 2 horas, según el número de muestras analizadas.
- La preparación de la prueba debe realizarse en una zona de trabajo específica para PCR o en un laboratorio de procedimientos previos a la PCR. Si no se dispone de una zona de trabajo específica para PCR, la prueba debe realizarse en un área del laboratorio dedicada[13], separada de las áreas utilizadas para la extracción de DNA y que se limpie periódicamente con agentes descontaminantes de DNA.
- No obstante, evite el uso de reactivos descontaminantes de DNA cuando esté realizando la preparación del sistema de PCR en tiempo real, ya que pueden inhibir el ensayo.
- Utilice micropipetas para transferir líquidos. Deben utilizarse micropipetas de uso exclusivo para la preparación de estas reacciones; estas micropipetas deben descontaminarse con regularidad.
- Se recomienda utilizar puntas con filtro de baja retención para asegurarse de que no se pierda DNA durante el procedimiento de preparación.
- **Deben tomarse precauciones al manipular el Tubo 4. Este tubo contiene material de DNA de control positivo y la contaminación podría dar lugar a resultados positivos falsos en la prueba.**
- Use guantes siempre.
- Todos los tubos de reactivos deben cerrarse después de usarlos y antes de desecharlos.
- Asegúrese de anotar con exactitud las posiciones que ocupan las muestras en la placa de 96 pocillos en un plan de placas.

## Procedimiento de uso:

**1. Preparación del sistema de PCR en tiempo real**

1.1 Para comenzar, encienda el sistema de PCR en tiempo real (el instrumento y el ordenador asociado) e inicie el software correspondiente. Introduzca los nombres de usuario y las contraseñas requeridos.

1.2 Asegúrese de que se haya limpiado el área de trabajo con reactivos descontaminantes de DNA y de que se haya dejado secar completamente; evite usar estos productos durante la preparación del ensayo, ya que un exceso de solución limpiadora puede inhibir las reacciones de PCR.

1.3 Una bolsa contiene un tubo de cada tipo: Tubo 1, Tubo 2, Tubo 3 y Tubo 4. Hay suficientes reactivos en una bolsa para realizar 8 reacciones. Deben realizarse al menos una reacción de control positivo y una reacción de control negativo en cada serie analítica en la que los reactivos sean del mismo lote del kit. Por lo tanto, con una bolsa se pueden analizar 6 muestras de paciente. Si es necesario analizar más de 6 muestras, se puede usar más de una bolsa si las bolsas usadas proceden del mismo lote del kit. Se puede analizar un máximo de 38 muestras de paciente usando las 5 bolsas de un kit.

1.4 Calcule el número de reacciones necesarias; para ello, consulte la tabla siguiente:

| Número de bolsas | Número máximo de muestras de paciente |
|---|---|
| 1 | 6 |
| 2 | 14 |
| 3 | 22 |
| 4 | 30 |
| 5 | 38 |

1.5 Saque el número apropiado de bolsas del congelador. No use ninguna bolsa que ya no esté sellada. Si se congelaron las muestras de paciente después de la extracción, sáquelas también del congelador.

1.6 Rasgue el número de bolsas necesarias para abrirlas y saque los tubos. Si se va a usar más de una bolsa, pero solamente se va a procesar un conjunto de controles positivo y negativo, sólo es necesario extraer los Tubos 3 y 4 de una bolsa. **Deben tomarse precauciones al manipular el Tubo 4. Este tubo contiene material de DNA de control positivo y la contaminación podría dar lugar a resultados positivos falsos en la prueba.**

1.7 Deje que se descongele el contenido de los tubos colocándolos en el banco de laboratorio durante 5-10 minutos, asegurándose de que se haya descongelado totalmente el contenido de todos los tubos antes de continuar. Mezcle en la agitadora vorticial el contenido de los tubos y las muestras de paciente y, a continuación,

[13] For example see Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

centrifúguelos en una microcentrifugadora mediante un ciclo corto para asegurarse de que todo el contenido se acumule en el fondo de los tubos antes de usarlos.

1.8 Coloque la placa de 96 pocillos en una gradilla de soporte. Tome precauciones para tocar con las manos únicamente el borde de la placa.

1.9 Siempre debe prepararse primero el control negativo, seguido de las muestras de paciente. El control positivo debe prepararse siempre en último lugar.

1.10 En la siguiente tabla se muestran los volúmenes de reactivo y de DNA:

| **Reactivo** | **Reacción** | | |
|---|---|---|---|
| | **Control negativo** | **Muestra de paciente** | **Control positivo** |
| **Tubo 1 (tapón naranja)** | 7.5 µL | 7.5 µL | 7.5 µL |
| **Tubo 2 (tapón verde)** | 7.5 µL | 7.5 µL | 7.5 µL |
| **Tubo 3 (tapón transparente)** | 10 µL | - | - |
| **Muestra de paciente** | - | 10 µL | - |
| **Tubo 4 (tapón negro)** | - | - | 10 µL |
| Volumen total | 25 µL | 25 µL | 25 µL |

1.11 Añada los reactivos en el orden mostrado en la tabla anterior: Tubo 1 y luego el Tubo 2, seguidos de la plantilla (control negativo, muestra de paciente o control positivo). **Tenga cuidado** al tomar muestras parciales del Tubo 1, ya que el líquido es ligeramente viscoso y puede adherirse al borde interno del tubo. Si sucediese esto, vuelva a centrifugar para acumular el contenido final en la base del tubo antes de intentar extraer las muestras parciales finales.

1.12 Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia de líquido. Vuelva a cerrar los tubos de reactivos después de usarlos y deséchelos inmediatamente, así como el contenido restante, en un recipiente de cierre hermético para residuos clínicos. Los reactivos no usados no pueden guardarse para un uso posterior.

1.13 Tome precauciones especiales al pipetear el Tubo 4 (DNA de control positivo) para asegurarse de que no contamine ningún otro tubo de reacción. Cierre las tapas de los otros tubos de reacción antes de abrir el Tubo 4 para reducir el riesgo de contaminación cruzada.

1.14 Anote las posiciones que ocupan todas las muestras en la placa en un plan de placas. Selle la placa con cuidado y a conciencia con la película de sellado de grado óptico, tomando precauciones para garantizar que los bordes queden firmemente adheridos. Centrifugue la placa en una centrifugadora a 900 g durante 1 minuto. Compruebe que no haya burbujas en el fondo de los pocillos. Si las hay, centrifugue de nuevo.

1.15 Continúe en la sección 2 inmediatamente. Las reacciones del ensayo MycAssay™ Aspergillus son estables en el banco durante un máximo de 60 minutos.

1.16 Después de la preparación de la PCR, asegúrese de que se limpie meticulosamente el área de trabajo usando reactivos descontaminantes de DNA.

## 2. Procesamiento de la serie analítica

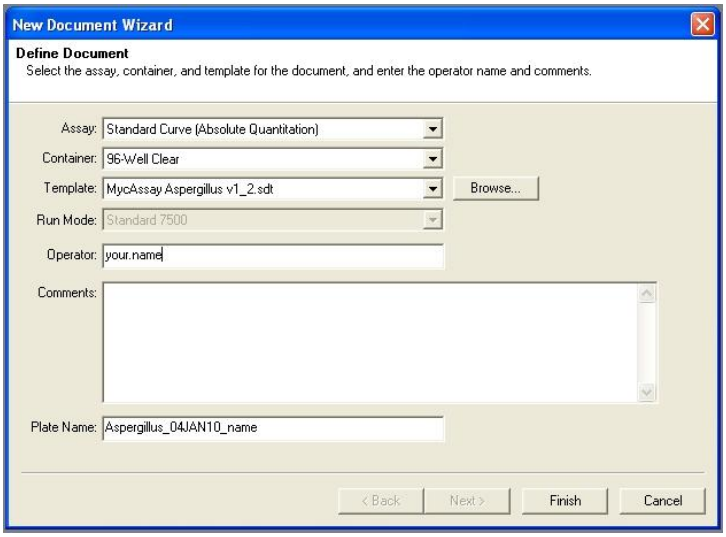
2.1 Abra el software SDS del sistema AB 7500, versión 1.4, e introduzca su nombre de usuario y su contraseña.

2.2 Inserte el CD-ROM **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol**.

2.3 En el menú **Quick Startup**, seleccione la opción de crear un documento nuevo (primera opción), **Create New Document...**

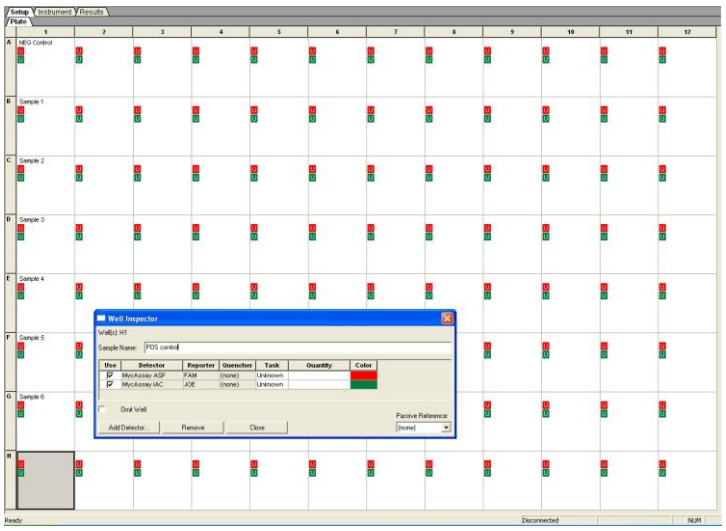
2.4 Escoja los parámetros tal y como se muestra a continuación. Seleccione la plantilla **MycAssay Aspergillus v1_2.sdt** del CD-ROM haciendo clic en **Browse…**

2.5 Introduzca en el campo “Plate Name” un nombre de placa adecuado para la serie analítica. A continuación se muestra un ejemplo:




2.6 Haga clic en **Finish**. Se abrirá un documento nuevo que contendrá los parámetros de PCR y los detectores establecidos automáticamente para este ensayo. En la vista **Plate** de la ficha **Setup**, utilice **Well Inspector** (seleccione un pocillo y pulse Ctrl+1 o haga clic con el botón secundario del ratón) para nombrar los pocillos según las posiciones de las muestras en 1.12.

Por ejemplo:




2.7 Cuando haya nombrado correctamente todos los pocillos, guarde la serie analítica, manteniendo el nombre de placa (**Plate Name**) como nombre de archivo.

2.8 Inicie la serie analítica en la ficha **Instrument** haciendo clic en el botón **Start**.

2.9 Para determinar cuánto tiempo tardará en finalizar la serie analítica, se muestra una cuenta atrás junto al botón **Start**.

# 3. Análisis e interpretación de los datos

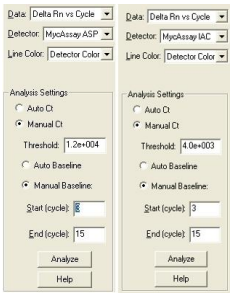
3.1 Una vez finalizada la serie analítica, haga clic en la flecha verde situada en la barra de menú superior para actualizar.

3.2 Abra la vista **Amplification Plot** de la ficha **Result**. En el lado derecho, establezca los umbrales para cada canal de la forma siguiente:

Asp MycAssay = 12000
IAC MycAssay = 4000

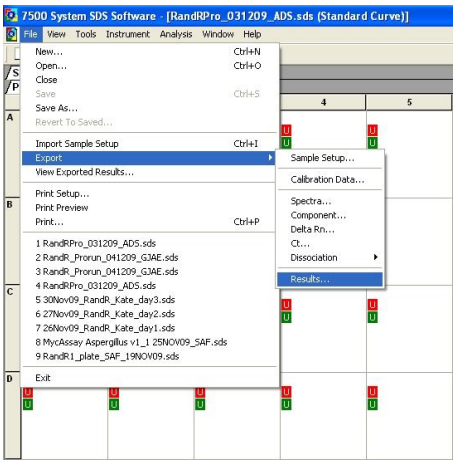
Los valores para **Manual Baseline** deben permanecer en 3 - 15 para ambos detectores.

3.3 Haga clic en el botón **Analyze** para activar estos cambios. Por ejemplo:




3.4 Guarde los cambios.

3.5 Seleccione los pocillos que contienen las muestras y exporte el archivo de informe siguiendo la secuencia **File**>**Export**>**Results...** como se muestra a continuación:

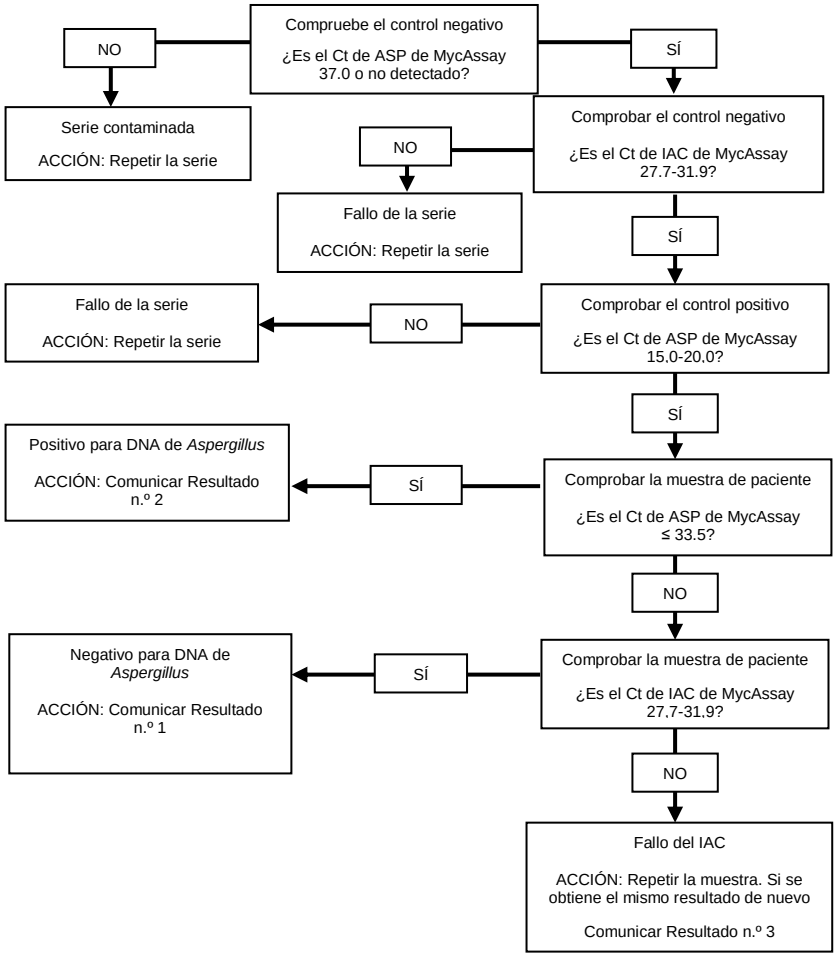



3.6 Para evitar confusiones, guarde el archivo con el mismo nombre utilizado para el propio archivo de la serie analítica. Recuerde guardar el archivo en un lugar apropiado.

3.7 Cuando se le indique, active **Export only selected wells** y haga clic en **OK**.

3.8 Abra el archivo .csv guardado con Excel o con un programa de hoja de cálculo similar.

3.9 Analice cada muestra, comenzando con los controles, como se muestra en la gráfica de flujo a continuación (también encontrará detalles en la tabla que aparece bajo la gráfica de flujo):


Compruebe el control negativo
¿Es el Ct de ASP de MycAssay 37.0 o no detectado?
NO
SÍ
Serie contaminada
ACCIÓN: Repetir la serie
Comprobar el control negativo
¿Es el Ct de IAC de MycAssay 27.7-31.9?
NO
Fallo de la serie
ACCIÓN: Repetir la serie
SÍ
Fallo de la serie
ACCIÓN: Repetir la serie
NO
Comprobar el control positivo
¿Es el Ct de ASP de MycAssay 15,0-20,0?
SÍ
Positivo para DNA de *Aspergillus*
ACCIÓN: Comunicar Resultado n.º 2
SÍ
Comprobar la muestra de paciente
¿Es el Ct de ASP de MycAssay ≤ 33.5?
NO
Negativo para DNA de *Aspergillus*
ACCIÓN: Comunicar Resultado n.º 1
SÍ
Comprobar la muestra de paciente
¿Es el Ct de IAC de MycAssay 27,7-31,9?
NO
Fallo del IAC
ACCIÓN: Repetir la muestra. Si se obtiene el mismo resultado de nuevo
Comunicar Resultado n.º 3

| **Muestra** | **Ct de ASP de MycAssay** | **Ct de IAC de MycAssay** | **Interpretación** | **Acción que debe realizarse** |
|---|---|---|---|---|
| Control negativo | 37.0 o no detectado | Entre 27.7 y 31.9 | Control negativo aceptable | Los resultados del paciente son validos |
| Control negativo | 37.0 o no detectado | < 27.7 o > 31.9 | Fallo en el control negativo | Repetir toda la serie analítica |
| Control negativo | < 37.0 | Entre 27.7 y 31.9 | Contaminación | Repetir toda la serie analítica |
| Control positivo | Entre 15.0-20.0 | N/A | Control positivo aceptable | Los resultados del paciente son validos |
| Control positivo | < 15.0 o > 20.0 | N/A | Fallo en el control positivo | Repetir toda la serie analítica |
| Paciente | > 33.5 | Entre 27.7-31.9 | Negativo para *Aspergillus* en el CCO* | Comunicar resultado: Resultado n. 1 |
| Paciente | ≤ 33.5 | N/A | Positivo para *Aspergillus* en el CCO* | Comunicar resultado: Resultado n. 2 |
| Paciente | 37.0 o no detectado | < 27.7 o > 31.9 | Fallo del IAC en la muestra | Repetir la muestra: Resultado n. 3 |

*CCO = punto de corte clínico. Todos los resultados que se encuentren en ese valor o por debajo del mismo se consideran clínicamente positivos. En otras muestras se pueden informar valores de Ct > 33.5, pero éstos reflejan niveles normales o de fondo de la carga de *Aspergillus* en la muestra respiratoria.

Véase la generación de informes clínicos (Resultado n.º 1, 2 ó 3)

# 4. Resolución de problemas

### 4.1 El control negativo ha generado una señal positiva en el canal FAM:

- Se produjo contaminación durante la preparación. No pueden considerarse precisos los resultados de toda la serie analítica.

→ Repita toda la serie analítica, teniendo gran cuidado al añadir las plantillas, en particular el control positivo (Tubo 4), para asegurarse de que no se produzca una contaminación cruzada.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos sean debidamente descontaminados antes y después de su uso.

- Se ha colocado incorrectamente el control negativo en el instrumento.

→ Asegúrese de que los pocillos estén correctamente anotados en el software.

- Se han utilizado tubos o placas no recomendados.

→ Los umbrales sólo son válidos cuando se utiliza el material recomendado: placas de PCR con semifaldón de 96 pocillos de 0,2 ml con película de sellado de grado óptico (Star Lab, n.º de catálogo E1403-8200 y Applied Biosystems, n.º de catálogo 4311971).

### 4.2 El valor Ct del IAC del control negativo se encuentra fuera del intervalo aceptable:

- Se ha inhibido la PCR.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos estén completamente secos después de usar agentes descontaminantes antes de proceder a la preparación para la PCR.

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado Conservación de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- No se ha añadido el reactivo de los Tubos 1 ó 2 a la reacción de PCR o se ha añadido una cantidad dos veces mayor del Tubo 2.

→ Repita la serie analítica teniendo cuidado en la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observan niveles más altos o más bajos de líquido en un pocillo en comparación con los otros.

- Se han utilizado tubos o placas no recomendados.

→ Los umbrales sólo son válidos cuando se utiliza el material recomendado: placas de PCR con semifaldón de 96 pocillos de 0,2 ml con película de sellado de grado óptico (Star Lab, n.º de catálogo E1403-8200 y Applied Biosystems, n.º de catálogo 4311971).

### 4.3 El control positivo es negativo:

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado Conservación de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- Se produjo un error durante el paso 1.12 y la plantilla de control positivo (Tubo 4) se colocó en el tubo de reacción erróneo.

→ Repita la serie analítica teniendo extremo cuidado durante la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observa un nivel más alto de líquido en un tubo de reacción y un nivel más bajo en otro en comparación con el nivel normal.

- No se ha añadido el reactivo de los Tubos 1 ó 2 a la reacción.

→ Repita la serie analítica teniendo cuidado en la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observan niveles más bajos de líquido en este pocillo que en los otros.

- Se ha colocado incorrectamente el control positivo en el instrumento.

→ Tenga cuidado de que los pocillos estén correctamente anotados en el software.

- Se han utilizado tubos o placas no recomendados.

→ Los umbrales sólo son válidos cuando se utiliza el material recomendado: placas de PCR con semifaldón de 96 pocillos de 0,2 ml con película de sellado de grado óptico (Star Lab, n.º de catálogo E1403-8200 y Applied Biosystems, n.º de catálogo 4311971).

### 4.4 Las muestras de paciente generan el resultado 3, "Invalid":

- Es probable que las muestras clínicas extraídas contengan inhibidores de la PCR.

→ Recomendamos extraer DNA de las muestras clínicas usando el kit de extracción de DNA fúngico MycXtra™.

### 4.5 No se obtienen resultados para ningún canal con ninguna muestra o control:

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado Conservación de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- El equipo usado no tiene un funcionamiento óptimo.

→ Compruebe que el instrumento de PCR en tiempo real tiene el historial de mantenimiento actualizado y que ha sido totalmente calibrado según se describe en su Guía de instalación y mantenimiento.

- Se ha utilizado un protocolo incorrecto durante la preparación del software.

→ Consulte la sección 2 y elija el archivo del protocolo correcto, según se especifica para cada tipo/versión del software, del CD-ROM Myconostica Protocol. Sólo puede cargarse el archivo apropiado para el software. Repita la serie analítica usando el archivo del protocolo correcto.

Si tiene más preguntas o experimenta cualquier problema, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente (productsupport@lab21.com).

## Características de rendimiento y limitaciones

### Datos de rendimiento analítico del sistema AB7500

El kit se validó inicialmente utilizando el sistema Cepheid SmartCycler®. Ciertas afirmaciones sobre el rendimiento del ensayo se volvieron a validar con la plataforma AB7500, utilizando placas de PCR con semifaldón de 96 pocillos de 0,2 ml con película de sellado de grado óptico (Star Lab, n.º de catálogo E1403-8200 y Applied Biosystems, n.º de catálogo 4311971), y se describen a continuación. En los casos en los que no se esperaba que las diferencias entre las plataformas afectaran al rendimiento del ensayo y, por consiguiente, a la afirmación relativa al rendimiento, el estudio no se repitió. Estos resultados, obtenidos utilizando la plataforma SmartCycler®, se consideran transferibles a la plataforma AB7500.

### Sensibilidad analítica

Utilizando el protocolo protocolo del sistema AB7500 anteriormente descrito y las plantillas para PCR generadas en Myconostica, se determinó que el LoB para el ensayo MycAssay™ Aspergillus estaba en un valor Ct de 37.0, y que el LoD era < 25 copias de DNA diana, utilizando la cepa AF293 de *A. fumigatus*.

### Selectividad analítica

El DNA genómico extraído de especies de *Penicillium* genera resultados positivos. Esto se debe al hecho de que las secuencias de las dianas moleculares tienen un grado de conservación alto entre *Aspergillus* y *Penicillium*. Por consiguiente, debe señalarse que un resultado positivo con este ensayo puede deberse a una infección por *Penicillium* en lugar de a una infección por *Aspergillus*.

La selectividad analítica se analizó usando DNA extraído de diversas especies fúngicas y no fúngicas. Las siguientes especies no presentaron un resultado positivo:
*Blastomyces capitatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, especies de *Cladosporium*, *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotonila rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermium*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenkii*, *Trichosporon capitatum*. Las siguientes especies bacterianas no presentaron un resultado positivo: *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius*.

El DNA genómico humano no presenta un resultado positivo con este ensayo.

Las siguientes 3 especies fúngicas no se analizaron con el sistema AB7500, pero habían sido analizadas con el sistema SmartCycler®: *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* y *Alternaria alternata*. Las 3 dieron resultados negativos con el ensayo.

### Reproducibilidad y repetibilidad

La repetibilidad y la reproducibilidad fueron determinadas por cuatro operadores diferentes que analizaron un panel de siete plantillas diferentes por triplicado, para un total de 168 ensayos. Los experimentos se realizaron usando un lote fabricado del kit MycAssay™ Aspergillus en dos instrumentos diferentes situados en dos lugares diferentes del Reino Unido.

Los resultados se analizaron tomando como referencia el límite de blanco (LoB) y el punto de corte clínico (CCO). A una concentración tres veces mayor que el límite de detección (LoD), los resultados del 100% de las muestras analizadas eran concordantes (positivas) en el LoB y el 83% de las muestras eran concordantes en el CCO. A concentraciones más de tres veces mayores que el LoD, los resultados del 100% de las muestras eran concordantes tanto en el CCO como en el LoB. Para las plantillas negativas, todas las muestras analizadas fueron negativas en el CCO.

### Transferencia del punto de corte clínico

El punto de corte clínico de 36.0 se había establecido en el sistema SmartCycler®. Este punto de corte se transfirió analíticamente a la plataforma AB7500 utilizando una plantilla con una concentración de *Aspergillus* que había demostrado presentar ≥ 95% de resultados positivos en el CCO con la plataforma SmartCycler®. Se determinó un valor Ct de 33.5, que a continuación fue confirmado utilizando plantillas de 3 concentraciones diferentes.

**Se establecieron las siguientes afirmaciones sobre el rendimiento utilizando el sistema Cepheid SmartCycler®**

**Sustancias que producen interferencia (contraindicaciones de uso)**
Los siguientes compuestos fueron analizados a concentraciones clínicamente relevantes y se comprobó que no inhiben el ensayo: acetilcisteína, anfotericina, dipropionato de beclometasona, budesonida, colistimetato sódico, propionato de fluticasona, fumarato de formoterol dihidrato, bromuro de ipratropio, lidocaína, manitol, sulfato de salbutamol, salmeterol, cloruro sódico, cromoglicato sódico, terbutalina y tobramicina.

**Evaluación del rendimiento**
Se utilizaron muestras respiratorias (BAL) obtenidas de dos hospitales, extraídas con el kit MycXtra™ y almacenadas para evaluar el rendimiento del kit MycAssay™ Aspergillus con muestras clínicas. Se realizaron comparaciones con el diagnóstico clínico y con el cultivo.

Se determinó el valor de corte de un Ct de 36.0 después de la revisión del conjunto de datos de muestras procedentes de diferentes lugares y de diferentes poblaciones de pacientes. Se evaluaron diferentes puntos de corte con respecto a la probabilidad de diferenciar entre el estado de de enfermedad y el estado de ausencia de enfermedad.

**PCR frente al diagnóstico clínico**

| | Positivo clínico | Negativo clínico | | |
|---|---|---|---|---|
| Positivo con PCR | 31 | 1 | 0,97 | VPP |
| Negativo con PCR | 2 | 10 | 0,83 | VPN |
| | 0,94 Sensibilidad | 0,91 Especificidad | | |

**PCR frente al cultivo de *Aspergillus***

| | Positivo en cultivo | Negativo en cultivo | | |
|---|---|---|---|---|
| Positivo con PCR | 29 | 3 | 0,91 | VPP |
| Negativo con PCR | 2 | 10 | 0,83 | VPN |
| | 0,94 Sensibilidad | 0,77 Especificidad | | |

De las muestras analizadas, el 0,8% contenía inhibidores de la PCR, tal como indicó el IAC, tras la extracción con el kit MycXtra™.

**Generación de informes clínicos**
El kit MycAssay™ Aspergillus se ha diseñado para ser utilizado como ayuda para el diagnóstico. Los resultados deben considerarse en el contexto del estado clínico del paciente y de los resultados de otras pruebas diagnósticas.

Los siguientes son informes recomendados, que dependen de la interpretación del resultado del ensayo:

Resultado n.º 1
“Especies de *Aspergillus* no detectadas”

Resultado n.º 2
"Especies de *Aspergillus* detectadas; resultado positivo. Este ensayo también detecta especies de *Penicillium*.”

Resultado n.º 3
“La prueba fracasó; inhibidores u otra sustancia desconocida presentes”

## Limitaciones del procedimiento

- La principal limitación de este procedimiento es la calidad de la muestra primaria:
  - Si la muestra es muy pequeña o no se obtuvo de la zona afectada del pulmón, la prueba será menos sensible y puede dar un resultado falsamente negativo.
  - Las muestras obtenidas mediante lavado broncoalveolar deben centrifugarse antes de la extracción del DNA del sedimento.
  - Los datos también demostraron que una reducción del volumen de sobrenadante usado en el proceso de extracción, que se obtiene en el paso de centrifugación, reduce la proporción de inhibidores que entran en el sistema.

- Pueden producirse resultados positivos falsos si el agente infeccioso pertenece al género *Penicillium*, que no puede distinguirse del género *Aspergillus* con este kit.

- Aunque el procedimiento de extracción de DNA fúngico MycXtra™ se ha diseñado para eliminar los inhibidores de la PCR, no se han evaluado todos los fármacos ni poblaciones de pacientes.

- El procedimiento no se ha evaluado de forma exhaustiva con esputos ni se ha evaluado con muestras salinas inducidas ni en muestras procedentes de niños.

- Pueden obtenerse resultados positivos falsos por contaminación externa de la muestra original o de la prueba. Esta contaminación podría provenir de aire contaminado con *Aspergillus*, de una técnica experimental deficiente con respecto al control positivo o de contaminación externa (especialmente de la pipeta) con DNA de *Aspergillus*.

- Dado que se puede obtener un resultado positivo verdadero en pacientes con una colonización transitoria o persistente por el género *Aspergillus*, se requiere aplicar el criterio clínico para interpretar los resultados de la prueba, en el contexto de la enfermedad.

## AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

TopTaq™ Hot Start es suministrado por QIAGEN. QIAGEN® es una marca registrada de Qiagen GmbH, Hilden, Alemania.

Este producto se vende bajo autorización del Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, Estados Unidos, y puede usarse bajo los derechos de la patente del PHRI exclusivamente para diagnóstico *in vitro* en seres humanos.

SmartCycler® es una marca registrada de Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, Estados Unidos.

Parte de este producto está cubierta por una licencia exclusiva a una solicitud de patente propiedad del Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, Estados Unidos.

Applied BioSystems es una marca registrada de Applera Corporation o sus filiales en Estados Unidos y/o en ciertos otros países.

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882 Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE

IVD